



B17

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12N 15/28, C07K 13/00 C12P 21/02</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 90/07579</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. Juli 1990 (12.07.90)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP89/01564</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 19. Dezember 1989 (19.12.89)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 38 43 534.9 23. Dezember 1988 (23.12.88) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Carl-Bosch-Strasse 38, D-6700 Ludwigshafen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : DAUM, Lothar [DE/DE]; Reiherstrasse 25, D-6701 Otterstadt (DE). DOERPER, Thomas [DE/DE]; Luitpoldstrasse 3, D-6719 Bissersheim (DE). HILLEN, Heinz [DE/DE]; Max-Planck-Strasse 17, D-6733 Hassloch (DE). MOELLER, Achim [DE/DE]; Wilhelm-Busch-Strasse 51, D-6703 Limburg-erhof (DE). SCHOLLMEIER, Klaus [DE/DE]; Lessingstrasse 26, D-6944 Hemsbach (DE). WALKER, Nigel [GB/DE]; Bergstrasse 5, D-6915 Dossenheim (DE). KEILHAUER, Gerhard [DE/DE]; Industriestrasse 20, D-6701 Dannstadt-Schauernheim (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP89/01564</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 19. Dezember 1989 (19.12.89)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 38 43 534.9 23. Dezember 1988 (23.12.88) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Carl-Bosch-Strasse 38, D-6700 Ludwigshafen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : DAUM, Lothar [DE/DE]; Reiherstrasse 25, D-6701 Otterstadt (DE). DOERPER, Thomas [DE/DE]; Luitpoldstrasse 3, D-6719 Bissersheim (DE). HILLEN, Heinz [DE/DE]; Max-Planck-Strasse 17, D-6733 Hassloch (DE). MOELLER, Achim [DE/DE]; Wilhelm-Busch-Strasse 51, D-6703 Limburg-erhof (DE). SCHOLLMEIER, Klaus [DE/DE]; Lessingstrasse 26, D-6944 Hemsbach (DE). WALKER, Nigel [GB/DE]; Bergstrasse 5, D-6915 Dossenheim (DE). KEILHAUER, Gerhard [DE/DE]; Industriestrasse 20, D-6701 Dannstadt-Schauernheim (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP89/01564</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 19. Dezember 1989 (19.12.89)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 38 43 534.9 23. Dezember 1988 (23.12.88) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Carl-Bosch-Strasse 38, D-6700 Ludwigshafen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : DAUM, Lothar [DE/DE]; Reiherstrasse 25, D-6701 Otterstadt (DE). DOERPER, Thomas [DE/DE]; Luitpoldstrasse 3, D-6719 Bissersheim (DE). HILLEN, Heinz [DE/DE]; Max-Planck-Strasse 17, D-6733 Hassloch (DE). MOELLER, Achim [DE/DE]; Wilhelm-Busch-Strasse 51, D-6703 Limburg-erhof (DE). SCHOLLMEIER, Klaus [DE/DE]; Lessingstrasse 26, D-6944 Hemsbach (DE). WALKER, Nigel [GB/DE]; Bergstrasse 5, D-6915 Dossenheim (DE). KEILHAUER, Gerhard [DE/DE]; Industriestrasse 20, D-6701 Dannstadt-Schauernheim (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>			
<p>(54) Title: TUMOUR NECROSIS FACTOR MUTEINS</p> <p>(54) Bezeichnung: TUMOR NEKROSE FAKTOR MUTEINE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Polypeptides derived from tumour necrosis factors (TNF) differ from natural TNF by the substitution and/or deletion of amino acids. These novel polypeptides are useful therapeutic agents.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Es werden TNF-Polypeptide beschrieben, die sich von natürlichen TNF durch den Austausch und/oder durch Deletion von Aminosäuren unterscheiden. Die neuen Polypeptide eignen sich zur Bekämpfung von Krankheiten.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MR	Mauritanien
BB	Barbados	FR	Frankreich	MW	Malawi
BE	Belgien	GA	Gabon	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BJ	Benin	IT	Italien	SD	Sudan
BR	Brasilien	JP	Japan	SE	Schweden
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

TUMOR NEKROSE FAKTOR MUTEINE

Beschreibung

- 5 Die Erfindung betrifft neue, vom Tumor Nekrose Faktor (TNF) abgeleitete Polypeptide, deren Herstellung und deren Verwendung als Arzneimittel.

Von Carswell et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3666, 1975) wurde berichtet, daß das Serum von Endotoxin-behandelten Tieren, die zuvor mit dem
 10 Mycobakterien-Stamm Calmette-Guerin (BCG) infiziert worden waren, eine hämorrhagische Nekrose bei verschiedenen Tumoren in der Maus bewirkte. Diese Aktivität wurde dem Tumor Nekrose Faktor zugeschrieben. TNF zeigt auch eine zytostatische oder zytotoxische Wirkung gegenüber einer Vielzahl von transformierten Zelllinien in vitro, während normale menschliche und
 15 tierische Zelllinien davon nicht betroffen werden (Lymphokine Reports Vol. 2, pp 235-275, Academic Press, New York, 1981). Kürzlich wurde die biochemische Charakterisierung und das Gen für menschlichen TNF beschrieben (Nature 312, 724, 1984; J. Biol. Chem. 260, 2345, 1985; Nucl. Acids Res. 13, 6361, 1985).

20

Aus diesen Daten läßt sich folgende Proteinstruktur für das reife humane TNF ableiten:

ValArgSerSerSerArgThrProSerAspLysProValAlaHisValValAlaAsnPro
 25 GlnAlaGluGlyGlnLeuGlnTrpLeuAsnArgArgAlaAsnAlaLeuLeuAlaAsnGly
 ValGluLeuArgAspAsnGlnLeuValValProSerGluGlyLeuTyrLeuIleTyrSer
 30 GlnValLeuPheLysGlyGlnGlyCysProSerThrHisValLeuLeuThrHisThrIle
 SerArgIleAlaValSerTyrGlnThrLysValAsnLeuLeuSerAlaIleLysSerPro
 CysGlnArgGluThrProGluGlyAlaGluAlaLysProTrpTyrGluProIleTyrLeu
 35 GlyGlyValPheGlnLeuGluLysGlyAspArgLeuSerAlaGluIleAsnArgProAsp
 TyrLeuAspPheAlaGluSerGlyGlnValTyrPheGlyIleIleAlaLeu

- 40 Weiterhin wurde das TNF-Gen von Rind, Kaninchen und Maus beschrieben (Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51, 597, 1986).

Neben seinen zytotoxischen Eigenschaften ist TNF einer der Hauptbeteiligten an entzündlichen Reaktionen (Pharmac. Res. 5, 129, 1988). Im Tiermodell konnte die Beteiligung von TNF beim septischen Schock (Science 229,

869, 1985) und der Graft versus Host Disease (J. Exp. Med. 166, 1280, 1987) gezeigt werden.

Es wurde nun gefunden, daß bestimmte Polypeptide, die sich vom TNF ableiten, günstigere Eigenschaften besitzen.

Gegenstand der Erfindung sind TNF-Polypeptide der Formel

10 ValArgSerSerSerArgThrProSerAspLysProValAlaHisValValAlaAsnPro
GlnAlaGluGlyGlnLeuGlnTrpLeuAsnArgArgAlaAsnAlaLeuLeuAlaAsnGly
ValGluLeuArgAspAsnGlnLeuValValProSerGluGlyLeuTyrLeuIleTyrSer
15 GlnValLeuPheLysGlyGlnGlyCysProSerThrHisValLeuLeuThrHisThrIle
SerArgIleAlaValSerTyrGlnThrLysValAsnLeuLeuSerAlaIleLysSerPro
CysGlnArgGluThrProGluGlyAlaGluAlaLysProTrpTyrGluProIleTyrLeu
20 GlyGlyValPheGlnLeuGluLysGlyAspArgLeuSerAlaGluIleAsnArgProAsp
TyrLeuAspPheAlaGluSerGlyGlnValTyrPheGlyIleIleAlaLeu,

25 worin jedoch mindestens eine Aminosäure in den Positionen 9, 11, 15, 26, 35, 41, 44, 46, 52, 54, 56, 57, 61, 62, 78, 87, 95, 119, 121, 133, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 144, 150, 156 und/oder 157 durch eine andere natürliche α -Aminosäure ersetzt ist und N-terminal 1 bis 7 Aminosäuren fehlen können, sowie deren Salze mit physiologisch verträglichen Säuren.

30 Insbesondere sind Gegenstand der Erfindung die TNF-Polypeptide, in denen mindestens eine der folgenden Veränderungen vorliegt:

35	Position 9:	Ser ersetzt durch A
	Position 11:	Lys ersetzt durch A
	Position 15:	His ersetzt durch B oder C
	Position 26:	Leu ersetzt durch C
	Position 35:	Ala ersetzt durch C
	Position 41:	Val ersetzt durch C
40	Position 44:	Arg ersetzt durch A
	Position 46:	Asn ersetzt durch A
	Position 52:	Ser ersetzt durch A
	Position 54:	Gly ersetzt durch C
	Position 56:	Tyr ersetzt durch C

	Position 57:	Leu ersetzt durch C
	Position 61:	Gln ersetzt durch C
	Position 62:	Val ersetzt durch A oder C
	Position 78:	His ersetzt durch C oder B
5	Position 87:	Tyr ersetzt durch C
	Position 95:	Ser ersetzt durch C
	Position 119:	Tyr ersetzt durch C oder A
	Position 121:	Gly ersetzt durch C
	Position 133:	Ser ersetzt durch C
10	Position 136:	Ile ersetzt durch C
	Position 137:	Asn ersetzt durch A
	Position 138:	Arg ersetzt durch A, B oder C
	Position 139:	Pro ersetzt durch A, C oder B
	Position 140:	Asp ersetzt durch A oder C
15	Position 141:	Tyr ersetzt durch A
	Position 142:	Leu ersetzt durch C
	Position 144:	Phe ersetzt durch C oder A
	Position 150:	Val ersetzt durch A oder C
	Position 156:	Ala ersetzt durch C
20	Position 157:	Leu ersetzt durch B,

worin A eine Aminosäure mit geladener Seitenkette, B eine Aminosäure mit polarer ungeladener Seitenkette und C eine Aminosäure mit hydrophober Seitenkette bedeuten. A ist also Arg, His, Lys, Glu oder Asp; B Gln, Asn, Gly, Met, Cys, Ser oder Thr und C Phe, Leu, Ile, Trp, Tyr, Pro, Val oder Ala.

Vorzugsweise sind in dem TNF-Molekül nicht mehr als 10 Aminosäuren ab Position 9 deletiert oder verändert.

30

Als physiologisch verträgliche Säuren sind insbesondere zu nennen: Salzsäure, Zitronensäure, Weinsäure, Milchsäure, Phosphorsäure, Methansulfonsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Malonsäure, Schwefelsäure, L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, Brenztraubensäure, Schleimsäure, Benzoesäure, Glucuronsäure, Oxalsäure, Ascorbinsäure, Acetylglycin.

35

Zur Herstellung der neuen Polypeptide geht man von der cDNA des humanen TNFs aus, die man gemäß Nature 312, 724, 1984 erhält und in ein Plasmid einbaut. Dieses rekombinante Plasmid, das die genetische Information für

40

humanes TNF trägt, dient als Ausgangspunkt für die Herstellung der neuen TNF-Muteine.

Um die beabsichtigten Veränderungen in das Gen für den humanen TNF gezielt einzuführen, wird das TNF-cDNA-Fragment durch aufeinanderfolgende Spaltung mit Restriktionsenzymen und anschließende Elektrophorese durch ein Agarosegel rein hergestellt. Dieses TNF-Gen enthaltende Fragment wird in einen Polylinker eines Bakteriophagenvektors eingebaut (Gene 19,269-276).

10 Durch Transformation von E.coli mit diesem rekombinanten Vektor werden schließlich Phagen erhalten, die den codierenden Strang des humanen TNF-Gens tragen.

Zur gezielten Mutagenese des TNF-Gens werden Oligodesoxynukleotide chemisch synthetisiert, die partiell komplementär zur TNF-Sequenz sind. Diese Oligonukleotide besitzen eine durchschnittliche Länge von 23 Nukleotiden. Am 5'-Ende ist ein Bereich von etwa 10 Nukleotiden, der perfekt komplementär zum TNF-codierenden Strang ist. Anschließend folgt ein Abschnitt von 3 Nukleotiden, der nicht komplementär ist und die gewünschte Veränderung des TNF-Gens trägt. An diesen Abschnitt schließt sich ein etwa 10 Nukleotide langer Teil an, der wiederum perfekt komplementär zum TNF-codierenden Strang ist.

Deletionen werden erzeugt, indem man Oligodesoxynukleotide verwendet, die genau vor und hinter der zu deletierenden Gensequenz Komplementarität besitzen; dadurch wird ein Heteroduplex gebildet, in dem die zu deletierende Gensequenz einzelsträngig vorliegt.

Die so konstruierten Oligonukleotide werden mit der rekombinanten TNF-DNA hybridisiert. Anschließend wird mit einer Polymerase und Desoxynukleosidtriphosphaten der Heteroduplex zum vollständigen doppelsträngigen DNA-Molekül aufgefüllt und mit dem Enzym T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft.

Mit diesem DNA-Molekül werden kompetente E.coli Zellen transformiert und die so erhaltenen Phagen werden durch in situ Plaque-Testung untersucht (Science 196,180, 1977).

Dazu wird die auf Nitrocellulose überführte Phagen-DNA mit Hilfe des zur Mutagenese verwendeten Oligonukleotids, das radioaktiv markiert ist, durchgetestet.

Unter hochstringenten Bedingungen werden diejenigen Phagen durch Hybridisierung identifiziert, die die gewünschte Veränderung im TNF-Gen tragen. Die Bestätigung der Mutation erfolgt durch DNA-Sequenzierung.

Anschließend kann das mutierte TNF-Gen mittels Spaltung mit Restriktions-
enzymen aus dem rekombinierten TNF-Vektor herausgelöst und mittels
Gelelektrophorese in reiner Form isoliert werden. Zur Expression dieses
veränderten TNF-Gens in E.coli muß das TNF-Genfragment mit prokaryonti-
schen Signalen wie Promotoren, Terminatoren, ribosomalen Bindungsstellen
versehen werden (Winnacker, Gene und Clone, Verlag Chemie 1984, Seite
192ff). Anschließend wird mit diesem TNF-Expressionsvektor ein E.coli-
Stamm transformiert. Der so erhaltene rekombinante E.coli-Stamm wird zur
Produktion eines TNF-Muteins verwendet, indem man ihn in einem geeigneten
Nährmedium züchtet. Danach werden die Bakterien geerntet und lysiert. So
erhält man ein lösliches Gemisch aus E.coli-Proteinen, aus dem das
gewünschte TNF-Mutein durch bekannte Methoden der Proteinreinigung wie
Ammoniumsulfatpräzipitation, Ionenaustauschchromatographie und Umkehr-
phasenchromatographie in reiner Form isoliert werden kann.

Die neuen Muteine zeigen zum Teil gute zytotoxische Eigenschaften. Ein
anderer Teil der Muteine besitzt eine hohe Affinität für den zellulären
TNF-Rezeptor, ohne jedoch eine zytotoxische Aktivität zu besitzen. Sie
stellen also TNF-Antagonisten dar. Sie binden in Konkurrenz zu natürlichem
TNF an den zellulären TNF-Rezeptor und unterdrücken so die TNF-Wirkung.
Die neuen Muteine erweisen sich als wertvolle Arzneimittel, die zur Be-
handlung von neoplastischen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen sowie
zur Bekämpfung und Prophylaxe von Infektionen, Entzündungen und
Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen eingesetzt werden können. Durch
einfache Experimente kann geklärt werden, welche Wirkungsweise die
einzelnen Muteine besitzen. Mit einer TNF-sensitiven Zelle wird die
Zytotoxizität des Muteins durch Inkubation der Zelllinie in Gegenwart des
Muteins bestimmt. In einem zweiten Versuchsansatz inkubiert man die
Zelllinie mit dem entsprechenden Mutein in Gegenwart einer letal wirkenden
TNF-Menge. Dadurch kann die TNF-antagonisierende Wirkung nachgewiesen
werden. Außerdem wird durch ein in vitro Bindungsexperiment die Affinität
des Muteins zum zellulären TNF-Rezeptor bestimmt.

Die biologische Charakterisierung der neuen Muteine auf ihre agonistische
oder antagonistische Wirkung erfolgte in folgenden Testsystemen:

- I. Zytotoxizitätstest auf TNF-sensitiven Indikatorzellen,
- II. 40 Kompetition-Zytotoxizitätstest auf TNF-sensitiven
Indikatorzellen,
- III. Kompetition-Rezeptorbindungstest auf TNF-Rezeptor exprimierenden
Indikatorzellen.

I. Zytotoxizitätstest

Die agonistische Bewertung der neuen Muteine basiert auf deren zytotoxischer Wirkung auf TNF-sensitiven Zellen (z.B. L929, MCF-7, A204, U937). Der Test mit L929 und MCF-7 wurde wie folgt durchgeführt:

1. 100 µl Kulturmedium mit 3 bis 5 x 10³ frisch trypsinisierten, sich im exponentiellen Wachstum befindenden L929-Zellen (Maus) bzw. MCF-7-Zellen (Mensch) wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Flachboden-Kulturplatte pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die mit Wasserdampf gesättigte Luft im Brutschrank enthielt 5 Vol% CO₂.

Das L929-Kulturmedium enthielt 500 ml MEM Earle 1x (Boehringer, Mannheim), 50 ml hitzeinaktiviertes (30 min, 56°C) foetales Kälberserum (FCS), 50 ml L-Glutamin (200 mM), 5 ml 100x nichtessentielle Aminosäuren, 3 ml 1M HEPES-Puffer pH 7,2 und 50 ml Gentamycin (50 mg/ml).

Das MCF-7-Kulturmedium enthielt 500 ml MEM Dulbecco 1x (Boehringer, Mannheim), 100 ml hitzeinaktiviertes (30 min, 56°C) FCS, 5 ml L-Glutamin und 5 ml 100x nichtessentielle Aminosäuren.

2. Am folgenden Tag wurden 100 µl der zu prüfenden Mutein-Lösung zu den Zellkulturen gegeben und seriell 2-fach titriert. Zusätzlich wurden einige Zellkontrollen (d.h. nicht mit Mutein-Verdünnung behandelte Zellkulturen) und einige rhu-TNF-Kontrollen (d.h. mit rekombinanten humanen TNF behandelte Zellkulturen) mit angelegt. Die Kulturplatte wurde 48 h bei 37°C in einer Atmosphäre aus wasserdampf-gesättigter Luft mit 5 Vol.% CO₂ inkubiert.

3. Der Prozentsatz überlebender Zellen in den mit Mutein-Verdünnung behandelten Kulturen wurde mittels der Kristallviolett-Färbung bestimmt. Dazu wurden die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen durch Abschlagen der Testplatte entfernt. In jede Vertiefung wurden 50 µl Kristallviolettlösungen pipettiert.

Die Kristallviolettlösung hatte folgende Zusammensetzung:

3,75 g Kristallviolett
1,75 g NaCl
161,5 ml Ethanol
43,2 ml 37 % Formaldehyd
ad 500 ml Wasser

- Die Kristallviolettlösung blieb 20 min in den Vertiefungen und wurde dann ebenfalls abgeschlagen. Anschließend wurden die Platten jeweils 5 mal durch Eintauchen in Wasser gewaschen, um den nicht zellgebundenen Farbstoff zu entfernen. Der zellgebundene Farbstoff wurde durch Zugabe von 100 µl Reagenzlösung (50 % Ethanol, 0,1 % Eisessig, 49,9 % Wasser) in jede Vertiefung aus den Zellen extrahiert.
4. Durch Schütteln der Platten für 5 min erhielt man in jeder Vertiefung eine gleichmäßig gefärbte Lösung. Zur Bestimmung der überlebenden Zellen wurde die Extinktion der Färbelösung in den einzelnen Vertiefungen bei 540 nm gemessen.
5. Danach wurde, bezogen auf die Zellkontrolle, der 50 % Zytotoxizitätswert definiert und der Kehrwert der Probenverdünnung, die zu 50 % Zytotoxizität führt, als zytotoxische Aktivität der untersuchten Probe ermittelt.

II. Konkurrenz-Zytotoxizitätstest

Die antagonistische Bewertung der Muteine basiert auf deren Eigenschaft, die zytotoxische Wirkung von rhu-TNF auf TNF-sensitiven Zellen (z.B. L929, MCF-7, A204, U937) zu konkurrieren. Der Konkurrenz-Zytotoxizitätstest mit L929 und MCF-7-Zellen wurde wie folgt durchgeführt:

1. 100 µl Kulturmedium mit 3 bis 5 x 10³ frisch trypsinisierten, sich im exponentiellen Wachstum befindenden L929-Zellen (Maus) bzw. MCF-7-Zellen (Mensch) wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Flachboden-Kulturplatte pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die mit Wasserdampf gesättigte Luft im Brutschrank enthielt 5 Vol% CO₂.

Das L929-Kulturmedium enthielt 500 ml MEM Earle 1x (Boehringer, Mannheim), 50 ml für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviertes FCS, 5 ml L-Glutamin (200 mM), 5 ml 100x nichtessentielle Aminosäuren, 3 ml 1M HEPES-Puffer pH 7,2 und 500 µl Gentamycin (50 mg/ml).

Das MCF-7-Kulturmedium enthielt 500 ml MEM Dulbecco 1x (Boehringer, Mannheim), 100 ml hitzeinaktiviertes (30 min, 56°C) FCS, 5 ml L-Glutamin (200 mM) und 5 ml 100x nichtessentielle Aminosäuren.

2. Am nächsten Tag wurden 100 µl der zu prüfenden Mutein-Lösung zu den Zellkulturen zugegeben und seriell 2-fach titriert. Zu diesen Zellkulturen wurden dann 100 µl einer rhu-TNF-Verdünnung in Kulturmedium, die in der Endkonzentration in der Zellkultur eine 80-100 % zytotoxische Wirkung hat, zugegeben. Zudem wurden einige Zellkontrollen (d.h. nicht mit Mutein-Lösung und nicht mit rhu-TNF-Lösung behandelte Zellkulturen) und einige rhu-TNF-Kontrollen (=nur mit rhu-TNF-Lösung behandelte Zellkulturen) mit angelegt. Die Kulturplatte wurde dann 48 h bei 37°C in einer Atmosphäre aus wasserdampf-gesättigter Luft mit 5 Vol.% CO₂ inkubiert.

3. Der Prozentsatz überlebender Zellen in den mit Substanzlösung behandelten Kulturen wurde mittels der Kristallviolettfröbung bestimmt. Dazu wurden die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen durch Abschlagen der Testplatte entfernt. In jede Vertiefung wurden 50 µl Kristallviolettlösungen pipettiert.

Die Kristallviolettlösung hatte die in II.3 angegebene Zusammensetzung.

Die Kristallviolettlösung blieb 20 min in den Vertiefungen und wurde dann ebenfalls abgeschlagen. Anschließend wurden die Platten jeweils 5 mal durch Eintauchen in Wasser gewaschen, um den nicht zellgebundenen Farbstoff zu entfernen. Der zellgebundene Farbstoff wurde durch Zugabe von 100 µl Reagenzlösung (50 % Ethanol, 0,1 % Eisessig, 49,9 % Wasser) in jede Vertiefung aus den Zellen extrahiert.

4. Durch Schütteln der Platten für 5 min erhielt man in jeder Vertiefung eine gleichmäßig gefärbte Lösung. Zur Bestimmung der überlebenden Zellen wurde die Extinktion der Färbelösung in den einzelnen Vertiefungen bei 540 nm gemessen.

5. Danach wurde, bezogen auf die Zellkontrolle und die rhu-TNF-Kontrolle der 50 % Kompetitionswert definiert und die Probenkonzentration, die bei der vorgelegten rhu-TNF-Konzentration zu 50 % Konkurrenz der rhu-TNF-Zytotoxizität führt, als antagonistische Aktivität der untersuchten Probe ermittelt.

III. Konkurrenz-Rezeptorbindungstest

Sowohl die agonistische als auch die antagonistische Wirkung von Muteinen setzt voraus, daß letztere an den TNF-Rezeptor binden. Das

bedeutet, daß Muteine mit agonistischer bzw. antagonistischer Wirkung und rhu-TNF um die Bindung am TNF-Rezeptor auf TNF-sensitiven Indikatorzellen (z.B. U937) konkurrieren. Der Kompetition-Rezeptor-bindungstest wurde wie folgt durchgeführt:

5

1. 100 µl Medium mit verschiedenen Konzentrationen des zu prüfenden Muteins sowie des rhu-TNF (=Kontrolle) wurden in die Reaktionsgefäße pipettiert. Das Medium enthielt 500 ml PBS (Boehringer, Mannheim), 10 ml hitzeinaktiviertes (30 min, 56°C) FCS und 100 mg

10

Natriumazid.

15

2. Anschließend wurden 100 µl Medium mit 1 ng ¹²⁵Jod-markiertem rhu-TNF (Lactoperoxidase-Methode nach Bolton) in die Reaktionsgefäße gegeben und gemischt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung (NSB) wurde in den Reaktionsgefäßen das ¹²⁵Jod-markierte rhu-TNF (1 ng ¹²⁵J-rhu-TNF in 100 µl Medium) mit dem 200-fachen Überschuß an nicht radioaktiv markiertem rhu-TNF (200 ng rhu-TNF in 100 µl Medium) gemischt.

20

3. Dann wurden 100 µl Medium mit 2 x 10⁶ U937-Zellen (Mensch) in die Reaktionsgefäße pipettiert und gemischt. Die Reaktionsgefäße (Testvolumen 300 µl) wurden 90 min bei 0°C inkubiert. Nach 45 min wurden die Reaktionsansätze nochmals durchmischt.

25

4. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen 5 min bei 1800 rpm und 4°C zentrifugiert, 3 mal mit Medium gewaschen, quantitativ in Zählröhrchen überführt und die zellgebundene Radioaktivität in einem Clini Gamma Counter 1272 (LKB Wallac) bestimmt.

30

5. Nach Korrektur der Meßwerte um die unspezifische Bindung wurde, bezogen auf die Gesamtbindung, der 50 % Kompetitionswert definiert und die Probenkonzentration, die bei der vorgelegten ¹²⁵J-rhu-TNF-Konzentration zu 50 % Kompetition der ¹²⁵J-rhu-TNF-Bindung führt, als kompetitive Aktivität der

35

untersuchten Probe ermittelt.

Beispiel

40

A. Herstellung eines Vektors, der die cDNA des humanen TNFs trägt.

Ausgangsmaterial war das 578 bp lange TNF-cDNA-Fragment, das für die Aminosäuren 8 bis 157 codiert (Aval-Hind3-Fragment).

Dieses TNF-cDNA-Teilfragment wurde mit einem chemisch synthetisierten Adaptor, der für die Aminosäuren 1 bis 7 codiert, verknüpft und in einen geeigneten Vektor eingebaut.

5 Als Adaptor diene ein doppelsträngiges DNA-Molekül folgender Sequenz:

CGATACTACTATG(N)_x
TATGATGATAC(M)_xGGCT,

10 worin

x 0 oder eine durch 3 teilbare Zahl von 3 bis 21,

N A, G, C oder T und

15

M das jeweils komplementäre Nukleotid zu N sind.

Durch Variation der Adaptoren konnte die Sequenz am 5'-Ende der TNF-cDNA beeinflusst und somit nach erfolgter Genexpression der Amino-terminus des TNF-Proteins verändert werden.

20

Wurde für N₂₁ GTCAGATCATCTTCTCGAACC eingesetzt, so erhielt man die cDNA für die gesamte reife Form des humanen TNF (1-157), wobei vor der Aminosäure 1 ein Methionin eingebaut ist.

25

Für x gleich 0 erhielt man einen Adaptor, der nach Verknüpfung mit der TNF-cDNA für ein TNF-Protein codierte, bei dem die ersten 7 Aminosäuren am Aminoterminal deletiert sind. Weiterhin konnten durch Variation von N alle Deletionen zwischen 1 und 7 Aminosäuren am Amino-terminus des TNF erzeugt werden.

30

Die Adaptoren wurden durch vollautomatische chemische Synthese (Applied Biosystems 380A) hergestellt und durch präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese gereinigt.

35

Als Vektor diene ein 4,3 kb langes DNA-Molekül, das aus pBR322 durch Spaltung mit ClaI und Hind3 erhalten wurde.

40

0,2 pMol des 587 bp langen TNF-Fragmentes wurden mit 0,5 pMol des entsprechenden Adaptors und 0,1 pMol des Vektors mit Hilfe des Enzyms T4-DNA Ligase verknüpft. Mit dieser DNA wurden der E.coli-Stamm W3110 (ATCC 27325) transformiert und ein Klon mit der entsprechenden DNA-Sequenz isoliert.

B. Herstellung eines Einzelstrangvektors mit der codierenden Sequenz des humanen TNF

Der oben beschriebene TNF-cDNA-Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen EcoR1 und Hind3 gespalten. Man erhielt das 0,6 kb große TNF-cDNA-Fragment durch Gelelektrophorese und anschließende Extraktion aus dem Gel in reiner Form. 100 ng dieses Fragments wurden mit 1 µg des M13mp8-EcoR1-Hind3-Vektorfragments in 20 µl 50mM TrisHCl (pH=7,4), 10mM MgCl₂ 25mM Dithiothreitol und 1 mM ATP in Gegenwart von 5 Einheiten T4-DNA-Ligase gemischt und über Nacht bei 14°C inkubiert.

Mit diesem Gemisch wurde E.coli JM103 (erhältlich von der Firma Pharmacia) transformiert. Man isolierte durch Ausstanzen aus den Kulturplatten mehrere Plaques, die durch DNA-Sequenzierung auf TNF-cDNA-Insertion untersucht wurden. Der rekombinierte Phage mit dem codierenden Strang der TNF-cDNA wird M13-TNF genannt.

C. Herstellung von Vektoren mit veränderter TNF-Sequenz

Der oben beschriebene M13-TNF war das Ausgangsmolekül für die gezielte Mutagenese des TNF-Gens. Um die beabsichtigten Veränderungen einzuführen, benötigte man Oligodesoxynukleotide, die partiell komplementär zum TNF-codierenden Strang sind ("antisense Oligonukleotide"). Diese Oligonukleotide besitzen eine Länge zwischen 15 und 30 Nukleotiden; bevorzugt verwendet wurden Oligonukleotide mit einer Länge von 23 Nukleotiden. Dabei waren die ersten 10 Nukleotide perfekt komplementär zum TNF-codierenden Strang, dann folgte ein nicht-komplementärer Bereich, der die beabsichtigte Veränderung im TNF-Gen trug, und anschließend folgte wieder ein perfekt komplementärer Bereich von 10 Nukleotiden. Das antisense Oligonukleotid für den Austausch der Aminosäure Nr. 9 Serin gegen Asparaginsäure war

PCAGGCTTGTCGTCCGGGGTTCGA.

Das antisense Oligonukleotid für die Deletion der Aminosäure Nr 140 Asparaginsäure war

PAGTCGAGATAGGGCCGATTG.

Die für die Mutagenese verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tabelle 1

Nr.	Sequenz 5' - 3'
5	1 C A G G C T T G T C G T C C G G G G T T C G A
	2 G G G C T A C A G G C T C G T C A C T C G G G
	3 T T G C T A C A A C A G A G G C T A C A G G C
	4 T T G C T A C A A C A A C G G C T A C A G G C
	5 T T G C T A C A A C G G T G G C T A C A G G C
10	6 T T G C T A C A A C C T G G G C T A C A G G C
	7 A C T G G A G C T G T T C C T C A G C T T G A
	8 T G G C C A G G A G G A G A T T G G C C C G G
	9 C T C T C A G C T C C A T G C C A T T G G C C
	10 G C T G G T T A T C T T T C A G C T C C A C G
15	11 C C A C C A G C T G G T C A T C T C T C A G C
	12 A C A G G C C C T C G T C T G G C A C C A C C
	13 T G A G G T A C A C A A C C T C T G A T G G C
	14 A G T A G A T G A G G A A C A G G C C C T C T
	15 A G T A G A T G A G G A T C A G G C C C T C T
20	16 A G T A G A T G A G G A G C A G G C C C T C T
	17 G G G A G T A G A T A G C G T A C A G G C C C
	18 T G A A G A G G A C G A T G G A G T A G A T G
	19 C C T T G A A G A G G A T C T G G G A G T A G
	20 C C T T G A A G A G G A G C T G G G A G T A G
25	21 G G C T G A T G G T A G A G G T G A G G A G C
	22 G G C T G A T G G T T T C G G T G A G G A G C
	23 G G C T G A T G G T G G T G G T G A G G A G C
	24 G G C T G A T G G T A A C G G T G A G G A G C
	25 C C T T G G T C T G G A A G G A G A C G G C G
30	26 G G C A G G G G C T C T G G A T G G C A G A G
	27 G G C A G G G G C T G T T G A T G G C A G A G
	28 C C C C T C C C A G G A A G A T G G G C T C A
	29 C C C C T C C C A G A C G G A T G G G C T C A
	30 C C C C T C C C A G A A C G A T G G G C T C A
35	31 G G A A G A C C C C A G C C A G A T A G A T G
	32 G G A A G A C C C C A A C C A G A T A G A T G
	33 T G A T C T C A G C A A C G A G T C G G T C A
	34 C G G G C C G A T T A A C C T C A G C G C T G
	35 A G T C G G G C C G G T C G A T C T C A G C G
40	36 G A T A G T C G G G G T C A T T G A T C T C A
	37 G A T A G T C G G G G A C C A T T G A T C T C A
	38 G A T A G T C G G G G A G A T T G A T C T C A
	39 G A T A G T C G G G G A G A T T G A T C T C A
	40 C G A G A T A G T C G T C C C G A T T G A T C

Tabelle 1 (Fortsetzung)

	41	C G A G A T A G T C G A T C C G A T T G A T C
	42	C G A G A T A G T C A C C C C G A T T G A T C
5	43	A G T C G A G A T A A G G G G G C C G A T T G
	44	A G T C G A G A T A T T T G G G C C G A T T G
	45	A G T C G A G A T A T T T G G G C C G A T T G
	46	C A A A G T C G A G G T G G T C G G G C C G A
	47	C G G C A A A G T C G A A A T A G T C G G G C
10	48	C A G A C T C G G C A G C G T C G A G A T A G
	49	C A G A C T C G G C T T C G T C G A G A T A G
	50	C A G A C T C G G C G T G G T C G A G A T A G
	51	C A G A C T C G G C A C G G T C G A G A T A G
	52	T C C C A A A G T A G A G C T G C C C A G A C
15	53	T C C C A A A G T A G A T C T G C C C A G A C
	54	T C C C A A A G T A G T G C T G C C C A G A C
	55	C G A C T C A C A G A A C A A T G A T C C C A
	56	T G T C G A C T C A G C C G G C A A T G A T C
20	57	G G C G G G C T G T C T C A G C C C A G G G C A A T G

20 Diese Oligonukleotide wurden mittels konventioneller Methoden synthetisiert. Zum Gebrauch bei der Mutagenese wurden 10pMol des Oligonukleotids 30 min bei 37°C in 10 µl 50 mM TrisHCl (pH=7,5), 0,1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 0,1 mM ATP in Gegenwart von 5 Einheiten T4 Polynukleotid-Kinase phosphoryliert.

25 Zum Gebrauch als Probe (s. unten) wurden 2 pMol des synthetischen Oligonukleotids wie oben angegeben phosphoryliert, nur daß anstatt 0,1 mM ATP 1 µM γ -³²P-ATP verwendet wurde.

30 Die spezifische Aktivität lag im Bereich von 5·10⁶ cpm pro pMol Oligonukleotid.

35 Die Hybridisierung der Oligonukleotide mit der einzelsträngigen DNA von M13-TNF ergab nach Kettenverlängerung eine Heteroduplex-DNA, bei der ein Strang die mutierte DNA beinhaltet.

40 Zur partiellen Heteroduplexbildung wurden 300 ng M13-TNF DNA mit 1 pMol des phosphorylierten Oligonukleotids in 20 µl 10 mM TrisHCl (pH=7,5), 0,1 mM EDTA, 50 mMol NaCl auf 80°C (2 min), 50°C (5 min) und Raumtemperatur (5 min) erwärmt. Die Kettenverlängerung wurde durch Zugabe von 30 µl 50 mM TrisHCl (pH=8,0), 0,1 mM EDTA, 12 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 0,7 mM ATP, 0,07 mM dATP, 0,2 mM an dGTP, dTTP, dCTP, 2 Einheiten E.coli Polymerase I (großes Fragment) und 20 Einheiten T4 DNA-Ligase gestartet.

Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch 4 h bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C über Nacht inkubiert. Aliquots wurden mit Phenol extrahiert, die DNA mit Ethanol ausgefällt und in 15 µl Wasser gelöst. Die DNA dieser Aliquots wurde zur Transformation von E.coli JM 103 benutzt.

Bakterienkulturschalen (15 cm Durchmesser), die einige Hundert rekombinante Phagen-Plaques enthalten, wurden durch in situ Plaque-Hybridisierung (Science 196, 180, 1977) auf den mutierten Genotyp hin untersucht, indem man das entsprechende radioaktiv markierte Oligonukleotid (die Probe) und Nitrocellulosefilterabzüge der Phagen-Plaques hybridisierte (etwa 10⁶ cpm pro Filter). Die Hybridisierung geschah über Nacht bei 50°C, 40% Formamid und 5 · SSC (1 · SSC = 0,1 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat pH=7,2).

Die Filter wurden bei 45°C in 2 · SSC, 0,02% Natriumdodecylsulfat gewaschen, an der Luft getrocknet, auf einen Röntgenfilm aufgebracht und bei -70°C exponiert.

Es war notwendig, die Stringenz der Hybridisierung (durch Veränderung der SSC-Konzentration beim Waschen der Filter) für das entsprechende Oligonukleotid individuell einzustellen; jede Mutante variierte je nach Anzahl und Art der ausgetauschten oder deletierten Nukleotide in ihrer Fähigkeit, mit dem Oligonukleotid zu hybridisieren.

Ein mit der radioaktiv markierten Probe hybridisierender Phage wurde aus der Bakterienkulturplatte ausgestanzt und als Inokulum zur Infektion von E.coli JM 103 verwendet.

Aus dem Kulturüberstand wurde die einzelsträngige DNA, aus dem Zelniederschlag die doppelsträngige DNA präpariert.

Die einzelsträngige DNA wurde nach der Didesoxymethode (Proc.Natl.Acad.Sci., USA 74, 5463, 1977) sequenziert, um die Mutation zu bestätigen. Dann konnte aus der doppelsträngigen DNA durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen ClaI und Hind3 und anschließende Gelelektrophorese das Gen für das TNF-Mutein isoliert werden.

D. Produktion der TNF-Muteine

Das in den obigen Beispielen hergestellte Gen für ein TNF-Mutein wurde an seinem 5'-Ende (ClaI) mit Promotorsequenzen, wie z.B. lac-Promotor oder trp-Promotor und ribosomalen Bindungsstellen verknüpft. An seinem 3'-Ende (Hind3) enthielt das Gen einen Transkriptionsterminator, wie

den trpA-Terminator. Diese DNA-Sequenzen sind alle kommerziell erhältlich (Pharmacia-LKB, Freiburg).

5 Das so mit den nötigen Expressionssignalen versehene Gen für das TNF-Mutein wurde in einen Vektor wie z.B. pBR322 eingebaut. Mit diesem Vektor wurde der E.coli Stamm W3110 transformiert und die erhaltenen Klone auf TNF-Mutein-Produktion getestet. Dazu wurde der Bakterien-
10 Überstand nach Verdünnung in einem biologischen Test untersucht. Positive Bakterienklone werden bei 37°C in 10 l LB-Nährmedium gezüchtet.

E. Reinigung der Proteine

1 l Fermentationsbrühe eines eine neue Substanz produzierenden E.coli-Stamms wurden 30 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Rückstand wurde in
15 200 ml 0,4 M Argininhydrochlorid, 20 mM Natriumphosphat pH 8,5 aufgenommen und 30 min mit Ultraschall behandelt. Die Suspension wurde mit 6 ml 2M MnCl₂ versetzt und 45 min bei 3000 g zentrifugiert. Der
20 Überstand wurde mit verdünnter NH₃-Lösung auf pH 8,9 gebracht und mit festem Ammoniumsulfat auf 60 % Sättigung eingestellt.

Das Proteinpräzipitat wurde in 0,2 M Argininhydrochlorid pH 7,5 suspendiert und gegen 0,4 M Argininhydrochlorid pH 7,5 dialysiert.
25 Nach 16 h wurde mit verdünnter NH₃-Lösung auf pH 8,5 eingestellt und auf das 5fache Volumen mit Wasser verdünnt.

Diese Lösung wurde über eine mit 0,01 M Argininpuffer pH 8,5 äquilibrierte R -Sephacrose-Säule (Pharmacia) chromatographiert. Die
30 Elution erfolgte mit 0,02 M Na-Phosphat, 0,06 M NaCl. Das Eluat wurde nach dem Verdünnen auf das 2,5fache über eine mit 0,02 M Na-Phosphat pH 8,0 äquilibrierte S -Sephacrose-Säule (Pharmacia) chromatographiert. Nach Waschen der Säule mit Äquilibrierungspuffer erhielt man durch
Elution mit 0,05 M Na-Phosphat, 0,1 M NaCl, 0,1 M Arginin pH 8,6
35 SDS-Polyacrylamidgel-elektrophoretisch reines Protein.

So wurden durch Mutagenese mit den in Tabelle 1 aufgeführten Oligonukleotiden in der angegebenen Reihenfolge folgende TNF-Proteine hergestellt (Die Positionen geben die Stellung im TNF an, die
40 verändert ist):

Position 9: Ser ersetzt durch Asp
Position 11: Lys ersetzt durch Glu
Position 15: His ersetzt durch Ser
Position 15: His ersetzt durch Val
Position 15: His ersetzt durch Thr
Position 15: His ersetzt durch Gln

	Position	24:	Gly ersetzt durch Glu
	Position	35:	Ala ersetzt durch Leu
	Position	41:	Val ersetzt durch Met
	Position	44:	Arg ersetzt durch Lys
5	Position	46:	Asn ersetzt durch Asp
	Position	52:	Ser ersetzt durch Asp
	Position	54:	Gly ersetzt durch Val
	Position	56:	Tyr ersetzt durch Phe
	Position	56:	Tyr ersetzt durch Ile
10	Position	56:	Tyr ersetzt durch Leu
	Position	57:	Leu ersetzt durch Ala
	Position	61:	Gln ersetzt durch Ile
	Position	62:	Val ersetzt durch Ile
	Position	62:	Val ersetzt durch Leu
15	Position	62:	Val ersetzt durch His
	Position	78:	His ersetzt durch Ser
	Position	78:	His ersetzt durch Glu
	Position	78:	His ersetzt durch Thr
	Position	78:	His ersetzt durch Val
20	Position	87:	Tyr ersetzt durch Phe
	Position	87:	Tyr ersetzt durch His
	Position	95:	Ser ersetzt durch Val
	Position	119:	Tyr ersetzt durch Phe
	Position	119:	Tyr ersetzt durch Arg
25	Position	121:	Gly ersetzt durch Ala
	Position	121:	Gly ersetzt durch Val
	Position	133:	Ser ersetzt durch Val
	Position	136:	Ile ersetzt durch Val
	Position	137:	Asn ersetzt durch Asp
30	Position	138:	Arg ersetzt durch Asp
	Position	138:	Arg ersetzt durch Gly
	Position	138:	Arg ersetzt durch Leu
	Position	139:	Pro ersetzt durch Asp
	Position	139:	Pro ersetzt durch Ile
35	Position	139:	Pro ersetzt durch Gly
	Position	140:	Asp ersetzt durch Pro
	Position	140:	Asp ersetzt durch Lys
	Position	141:	Tyr ersetzt durch His
	Position	142:	Leu ersetzt durch Phe
40	Position	144:	Phe ersetzt durch Ala
	Position	144:	Phe ersetzt durch Glu
	Position	144:	Phe ersetzt durch His
	Position	144:	Phe ersetzt durch Arg
	Position	150:	Val ersetzt durch Leu

Position 150: Val ersetzt durch Ile
Position 150: Val ersetzt durch His
Position 156: Ala ersetzt durch Val
Position 157: Leu ersetzt durch Gly.

5

10

15

20

25

30

35

40

Patentansprüche

1. TNF-Polypeptide der Formel

5 ValArgSerSerSerArgThrProSerAspLysProValAlaHisValValAlaAsnPro
 GlnAlaGluGlyGlnLeuGlnTrpLeuAsnArgArgAlaAsnAlaLeuLeuAlaAsnGly
 ValGluLeuArgAspAsnGlnLeuValValProSerGluGlyLeuTyrLeuIleTyrSer
 10 GlnValLeuPheLysGlyGlnGlyCysProSerThrHisValLeuLeuThrHisThrIle
 SerArgIleAlaValSerTyrGlnThrLysValAsnLeuLeuSerAlaIleLysSerPro
 15 CysGlnArgGluThrProGluGlyAlaGluAlaLysProTrpTyrGluProIleTyrLeu
 GlyGlyValPheGlnLeuGluLysGlyAspArgLeuSerAlaGluIleAsnArgProAsp
 TyrLeuAspPheAlaGluSerGlyGlnValTyrPheGlyIleIleAlaLeu,

20

worin jedoch mindestens eine Aminosäure in den Positionen 9, 11, 15,
 26, 35, 41, 44, 46, 52, 54, 56, 57, 61, 62, 78, 87, 95, 119, 121, 133,
 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 144, 150, 156 und/oder 157 durch
 eine andere natürliche α -Aminosäure ersetzt ist und N-terminal 1 bis
 25 7 Aminosäuren fehlen können, sowie deren Salze mit physiologisch
 verträglichen Säuren.

2. TNF-Polypeptide gemäß Anspruch 1, in denen mindestens eine der
 folgenden Veränderungen vorliegt:

30

Position 9: Ser ersetzt durch A
 Position 11: Lys ersetzt durch A
 Position 15: His ersetzt durch B oder C
 Position 26: Leu ersetzt durch C
 35 Position 35: Ala ersetzt durch C
 Position 41: Val ersetzt durch C
 Position 44: Arg ersetzt durch A
 Position 46: Asn ersetzt durch A
 Position 52: Ser ersetzt durch A
 40 Position 54: Gly ersetzt durch C
 Position 56: Tyr ersetzt durch C
 Position 57: Leu ersetzt durch C

- Position 61: Gln ersetzt durch C
 Position 62: Val ersetzt durch A oder C
 Position 78: His ersetzt durch C oder B
 Position 87: Tyr ersetzt durch C
 5 Position 95: Ser ersetzt durch C
 Position 119: Tyr ersetzt durch C oder A
 Position 121: Gly ersetzt durch C
 Position 133: Ser ersetzt durch C
 Position 136: Ile ersetzt durch C
 10 Position 137: Asn ersetzt durch A
 Position 138: Arg ersetzt durch A, B oder C
 Position 139: Pro ersetzt durch A, C oder B
 Position 140: Asp ersetzt durch A oder C
 Position 141: Tyr ersetzt durch A
 15 Position 142: Leu ersetzt durch C
 Position 144: Phe ersetzt durch C oder A
 Position 150: Val ersetzt durch A oder C
 Position 156: Ala ersetzt durch C
 Position 157: Leu ersetzt durch B,

20

worin A eine Aminosäure mit geladener Seitenkette, B eine Aminosäure mit polarer ungeladener Seitenkette und C eine Aminosäure mit hydrophober Seitenkette bedeuten.

25 3. DNA codierend für ein TNF-Polypeptid gemäß Anspruch 1.

4. Vektor enthaltend eine DNA gemäß Anspruch 3.

5. Wirtsorganismus enthaltend einen Vektor gemäß Anspruch 4.

30

6. Verfahren zur Herstellung eines TNF-Polypeptids gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Wirtsorganismus nach Anspruch 5 züchtet und das TNF-Polypeptid daraus isoliert.

35 7. TNF-Polypeptide gemäß Anspruch 1 zur Verwendung bei der Bekämpfung von Krankheiten.

8. Verwendung der TNF-Polypeptide gemäß Anspruch 1 zur Bekämpfung von neoplastischen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen sowie zur Bekämpfung und Prophylaxe von Infektionen, Entzündungen und Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen.

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 89/01564

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. ⁵ : C12 N 15/28, C 07 K 13/00, C 12 P 21/02		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched †		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁵	C 12 N; C 07 K; C 12 P	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ‡		
Category *	Citation of Document, † with indication, where appropriate, of the relevant passages ‡	Relevant to Claim No ‡
X	EP, A2, 0168214 (GENENTECH, INC.) 15 January 1986, see page 17, line 7 - line 10; page 63 - page 66, claims 1-83 ---	1-8
X	WO, A1, 86/02381 (CETUS CORPORATION) 24 April 1986, see page 9, line 10 - line 15	1-8
Y	---	1-8
Y	WO, A2, 88/06625 (CETUS CORPORATION) 7 September 1988, see page 9, line 16 - line 17; page 4 - page 5, claims 1-19 ---	1-8
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>* Special categories of cited documents: ‡</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
20 March 1990 (20.03.90)	12 April 1990 (12.04.90)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
Y	EP, A2, 0251037 (DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 7 January 1988, see page 6 - page 12 ---	1-8
Y	EP, A2, 0155549 (DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 25 September 1985, see page 10 ---	1-8
A	EP, A2, 0247906 (MIZUNO, DEN'ICHI) 2 December 1987, see the whole document -----	1-8

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

PCT/EP 89/01564

SA

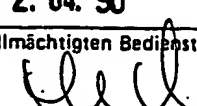
33273

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP-file on 28/02/90. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A2- 0168214	15/01/86	AU-D- 4465285 JP-A- 61040221 US-A- 4650674	09/01/86 26/02/86 17/03/87
WO-A1- 86/02381	24/04/86	NONE	
WO-A2- 88/06625	07/09/88	NONE	
EP-A2- 0251037	07/01/88	JP-A- 63119692	24/05/88
EP-A2- 0155549	25/09/85	AU-B- 584608 AU-D- 3944885 JP-A- 60185799 JP-A- 60232097 JP-A- 61050923	01/06/89 12/09/85 21/09/85 18/11/85 13/03/86
EP-A2- 0247906	02/12/87	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen **PCT/EP 89/01564**

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶ Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC IPC5: C 12 N 15/28, C 07 K 13/00, C 12 P 21/02		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
IPC5	C 12 N; C 07 K; C 12 P	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	EP, A2, 0168214 (GENENTECH, INC.) 15 Januar 1986, siehe Seite 17, Zeile 7 - Zeile 10; Seite 63 - Seite 66, Ansprüche 1-83 --	1-8
X	WO, A1, 86/02381 (CETUS CORPORATION) 24 April 1986, siehe Seite 9, Zeile 10 - Zeile 15	1-8
Y	--	1-8
Y	WO, A2, 88/06625 (CETUS CORPORATION) 7 September 1988, siehe Seite 9, Zeile 16 - Zeile 17; Seite 4 - Seite 5, Ansprüche 1-19 --	1-8
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
20. März 1990	12. 04. 90	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
Europäisches Patentamt	 F.W. HECK	

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN - (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP, A2, 0251037 (DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 7 Januar 1988, siehe Seite 6 - Seite 12 --	1-8
Y	EP, A2, 0155549 (DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 25 September 1985, siehe Seite 10 --	1-8
A	EP, A2, 0247906 (MIZUNO, DEN'ICHI) 2 Dezember 1987, siehe Dokument insgesamt -- -----	1-8

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

PCT/EP 89/01564

SA 33273

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 28/02/90

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A2- 0168214	15/01/86	AU-D- 4465285	09/01/86
		JP-A- 61040221	26/02/86
		US-A- 4650674	17/03/87

WO-A1- 86/02381	24/04/86	KEINE	

WO-A2- 88/06625	07/09/88	KEINE	

EP-A2- 0251037	07/01/88	JP-A- 63119692	24/05/88

EP-A2- 0155549	25/09/85	AU-B- 584608	01/06/89
		AU-D- 3944885	12/09/85
		JP-A- 60185799	21/09/85
		JP-A- 60232097	18/11/85
		JP-A- 61050923	13/03/86

EP-A2- 0247906	02/12/87	KEINE	

EPO FORM P073